TOYOBO

SYBR® Green Realtime PCR Master Mix

(Code No. QPK-201, QPK-201T)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department

OSAKA JAPAN

【 目　次 】

［1］はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ (2)
［2］ご使用にあたっての留意点・・・・・・・・・・・・・・・ (2)
［3］本品に含まれるもの・・・・・・・・・・・・・・・・・・ (3)
［4］ご用意いただくもの・・・・・・・・・・・・・・・・・・ (3)
［5］プロトコール・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ (5)
　１．ABI PRISM®7700を用いたインターカレーターアッセイ・ (5)
　２．Roche LightCycler™を用いたインターカレーターアッセイ (7)
　３．BioFlux LineGeneを用いたインターカレーターアッセイ・ (9)
　４．逆転写酵素添加による1ステップ RT-PCR ・・・・・・・ (10)
［6］トラブルシューティング・・・・・・・・・・・・・・・・ (12)
［7］関連商品・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ (13)

【 ご注意 】

本製品は研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないで下さい。本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意して下さい。

本製品は、F. Hoffmann-La Roche Ltd.、Roche Molecular Systems Inc.**並びに**The Perkin-Elmer Corporation**とのライセンス契約に基づき販売されるものです。**
“Purchase of this product is accompanied by a limited license to use it in the Polymerase Chain Reaction (PCR) process for The Research Field in conjunction with a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, either by payment to Perkin-Elmer or as purchased, i.e., an authorized thermal cycler.”

※LightCycler™**は、**Idaho Technology Inc.**並びに**Roche Molecular Systems Inc.**の商標です。**
※SYBR®**は、**Molecular Probes Inc.**の登録商標です。**
※ABI PRISM®**は、**The Perkin-Elmer Corporation**の登録商標です。**

［1］はじめに

1．本品の概要

本製品は、プライマーとサンプルDNA以外の全ての組成を含む2×マスターミックスです。既にSYBR® Green I(Molecular Probes Inc.)を含有しているので、未標識のプライマーを用いてインターカレーターアッセイ法によるリアルタイム定量PCRを実施できます。

2．本品の特長

・高い汎用性

本製品は、ロシュ・ダイアグノスティックス社のLightCycler™など、ガラスキャピラリーを使用するシステムに対応するため、BSAを含有しています。一方、アプライドバイオシステムズ社のABI PRISM®7700などに対応したパッシブリファレンスも添加しています。このパッシブリファレンスは、LightCycler™など、これを利用しないシステムでの使用に影響がないことを確認しております。勿論、バイオフラックス社のLineGeneでもご使用いただけます。

・高速なホットスタートが可能

本製品は、非特異反応を抑えるため、Taq DNAポリメラーゼに抗Taqモノクローナル抗体を使用したホットスタートPCRを採用しております。その結果、極めて速やかな再活性化が可能になりました。従来は、ポリメラーゼの再活性化のために10分以上を要していた最初の変性工程が1分以内で完了、各サイクルの変性ステップも核酸の変性に必要な時間だけを考慮して設定いただけます。LightCycler™など高速なPCR装置では、その時間短縮メリットをよりいっそう生かすことができます。

［2］ご使用にあたっての留意点

1．ご使用についての注意事項

・本製品は研究用試薬です。診断・臨床用試薬として使用しないで下さい。また、本試薬に関する有害性の調査は十分ではありません。保護具を着用するなど、取扱いには十分ご注意下さい。

・融解直後は、緩やかに転倒混和して、十分に均質化して下さい。

2．保存について

本製品は、原則として-20℃以下で遮光して凍結保存します。ただし、融解後は2ヶ月程度を限度として4℃で保存して下さい。この場合も遮光する必要がありますので、遮光できる箱か、添付のアルミ袋で保存して下さい(QPK-201には、包装以外にもう1枚アルミ袋を添付しておりますので、-20℃と4℃でお使い分け下さい)。1本ずつ融解し、4℃保存で2ヶ月以内にご使用されることをお勧めします。やむを得ず融解したチューブを長期間(数ヶ月単位)使用しない場合は、-20℃で再凍結して下さい。

尚、当社内での検討では、4℃で80日程度保管しても、特に品質上の劣化が認められませんでした。また、20回凍結融解を繰り返しても使用可能でした。

［3］本品に含まれるもの

[SYBR® Green Realtime PCR Master Mix]

dNTP、$MgCl_2$、Taq DNAポリメラーゼや抗Taqモノクローナル抗体などのPCR反応組成およびSYBR® Green Iを含む溶液です。濃度は必要濃度の2倍になっています。

［4］ご用意いただくもの

１．本品の他に必要な試薬・機材

[プライマー]

検出・定量したい遺伝子配列に対応したプライマーペアをご用意下さい。正確な定量試験を繰り返し実施する必要がある場合は、PCRのサイクル条件やプライマー濃度など条件検討を実施した上で、最適のプライマーと反応条件を選択されることをお勧めします。

※プライマー設定について

プライマーは未標識で、20〜30mer、GC含量40〜60%、プライマーダイマーなどの発生が少ないように設計して下さい。インターカレーターアッセイでは、プライマーダイマーなどの非特異的な増幅産物も検出されてしまい、増幅曲線上は区別できません。高感度で定量性のあるデータを得るためには、プライマーの設計が最も重要です。

増幅領域の長さも重要です。傾向として、増幅領域が長いほど非特異反応が起こりやすくなります。また、増幅効率も低下するので、感度や定量性に影響があります。増幅領域は200bp以下、できれば150bp以下が望ましいです。新規に設計される場合は、50〜150bpを目安にしてください。成功率が上がります。

[蒸留水]

一般のPCRなどに使用可能な純度の水をご使用下さい。

[リアルタイムPCR装置]

アプライドバイオシステムズ社のABI PRISM®7700、ロシュ・ダイアグノスティックス社のLightCycler™、バイオフラックス社のLineGeneなどのリアルタイムPCR装置をご使用下さい。ご使用にあたっては各装置の取扱説明書に従って下さい。

２．サンプルDNA

[cDNA]

- 1st strand cDNA合成反応後、フェノール処理・エタノール沈殿などで精製したサンプルをご使用下さい。1st strand cDNA合成時のプライマーは、ランダムプライマー、オリゴdTプライマーのどちらであってもいいですが、PCR反応への持ち込み量にご注意下さい。
- 当社の1st strand cDNA合成キット「ReverTra Ace - α -®」(Code:FSK-101)の反応液であれば、10倍以上に希釈して、そのままご使用いただけます。原液でも増幅は致しますが、cDNA合成時のプライマーや(熱処理しても)逆転写酵素の混入がPCRの定量性に影響する場合があります。希釈してご使用することをお勧めします。

[ゲノムDNAなど]

通常のPCRに使用可能な精製度のDNAサンプルをご使用下さい。ヒトのゲノムDNAなどでは、1〜10ng程度が適当です。大量のゲノムDNAなどを加えると、それ自体のシグナルが検出され、ベースラインが上がることがあります。

［5］プロトコール

１．ABI PRISM®7700を用いたインターカレーターアッセイ

(1)反応液の調製

[PCR反応液(例)](プライマー 0.4μM、反応スケール 50μL)

蒸留水	16 μL
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	25 μL
プライマー 1 (10μM)	2 μL
プライマー 2 (10μM)	2 μL
サンプル溶液	5 μL
合計液量	50 μL

- SYBR® Green Realtime PCR Master Mixが合計液量の1/2であれば、その他の組成は最適な条件にご変更いただいて結構です。また、合計液量(反応スケール)を変更する場合は、最適条件の比率を維持して下さい。
- プライマーは最終0.2～0.6μMを中心にご検討下さい。増幅効率がよくない場合、増量することにより向上する場合があります。ただし、入れすぎると非特異反応の原因となる場合もあります。
- 実際の調製では、必要本数分＋αについて、サンプル溶液以外を含むプレミックス溶液を調製し、所定量をチューブに分注後、最後に、各々のチューブに、サンプル溶液を添加して下さい。

(2)PCRの実施

- 以下のサイクルは一例です。まずは、3ステップで、お試し下さい(例1)。アニール温度は、プライマーのTmなどにより、55℃～65℃程度を中心に調節して下さい。勿論、プライマーによっては、その範囲外に最適値がある場合もあります。
- 本品はポリメラーゼの再活性化が極めて短時間で完了しますので、最初の変性時間は60秒、各サイクルの変性時間も15秒でPCRは可能です。初期変性時間は大抵の場合、1分程度で十分です。必要以上の加熱は、酵素活性を低下させて結果に影響を及ぼす可能性がありますので、特に5分以上の変性は避けて下さい。
- Detectorは「SYBR」、Quencherは「None」で実施します。詳細は装置の取扱説明書をご参照下さい。
- リアルタイムPCRは一般的に長鎖の増幅を行なわないので、伸長時間の調節は不要ですが、変更する場合、data collectionのステップは30秒以上確保する必要があります。
- 2ステップでも可能です(例2)。この場合、data collectionはアニール・伸長ステップに設定して下さい。

[PCR**サイクル**(**例**1)](3**ステップ、アニール** 60**℃**／**伸長** 72**℃**)

95**℃** 60**秒**

↓

95**℃** 15**秒**
60**℃** 15**秒**
72**℃** 45**秒**(data collection) ）×40**サイクル**

[PCR**サイクル**(**例**2)](2**ステップ、アニール**／**伸長** 60**℃**)

95**℃** 60**秒**

↓

95**℃** 15**秒**
60**℃** 60**秒**(data collection) ）×40**サイクル**

２．Roche LightCycler™を用いたインターカレーターアッセイ

(1)反応液の調製

[PCR反応液(例)](プライマー 0.4μM、反応スケール 20μL)

蒸留水	6.4 μL
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	10 μL
プライマー 1 (10μM)	0.8 μL
プライマー 2 (10μM)	0.8 μL
サンプル溶液	2 μL
合計液量	20 μL

- SYBR® Green Realtime PCR Master Mixが合計液量の1/2であれば、その他の組成は最適な条件にご変更いただいて結構です。また、合計液量(反応スケール)を変更する場合は、最適条件の比率を維持して下さい。
- プライマーは最終0.2～0.6μMを中心にご検討下さい。増幅効率がよくない場合、増量することにより向上する場合があります。ただし、入れすぎると非特異反応の原因となる場合もあります。
- 実際の調製では、必要本数分＋αについて、サンプル溶液以外を含むプレミックス溶液を調製し、所定量をキャピラリーに分注後、最後に、各々のキャピラリーに、サンプル溶液を添加して下さい。

(2)PCRの実施

- 以下のサイクルは一例です。アニール温度は、プライマーのTmなどにより、55℃～65℃程度を中心に調節して下さい。勿論、プライマーによっては、その範囲外に最適値がある場合もあります。まずは、アニール温度55℃、アニール時間10秒でお試し下さい。増幅が悪い場合は、20秒程度まで、延長して下さい。また、プライマーダイマーの発生など、非特異反応の発生が見られる場合は、5秒程度まで短縮して下さい。
- 本品はポリメラーゼの再活性化が極めて短時間で完了しますので、最初の変性時間は30秒、各サイクルの変性時間も5秒設定でPCRは可能です。初期変性時間は大抵の場合、1分程度で十分です。必要以上の加熱は、酵素活性を低下させて結果に影響を及ぼす可能性がありますので、特に5分以上の変性は避けて下さい。
- 伸長時間は、増幅領域が200bp以内であれば通常は15秒で十分ですが、こちらも状況に応じて調節して下さい。ただ、data collectionのステップは10秒以上確保する必要があります(装置の検出動作のため)。
- DetectorはF1で実施して下さい。また、通常はTemperature Transition Rateはすべて20℃/sec(最大)で問題ありません。詳細は装置の取扱説明書をご参照下さい。
- 2ステップでも可能です。非特異反応の発生状況などを見てお試し下さい。この場合、data collectionはアニール・伸長ステップに設定して下さい。

[PCR**サイクル**(**例**)](3**ステップ、アニール** 55**℃**／**伸長** 72**℃**)

95**℃** 30**秒**

↓

95**℃** 5**秒**

55**℃** 10**秒**

72**℃** 15**秒**(data collection)

×40**サイクル**

↓

融解曲線(Melting Curve)**解析**

３．BioFlux LineGeneを用いたインターカレーターアッセイ

(1)反応液の調製

[PCR反応液(例)](プライマー 0.4μM、反応スケール 10μL)

蒸留水	2.2	μL
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	5	μL
プライマー 1 (10μM)	0.4	μL
プライマー 2 (10μM)	0.4	μL
サンプル溶液	2	μL
合計液量	10	μL

- SYBR® Green Realtime PCR Master Mixが合計液量の1/2であれば、その他の組成は最適な条件にご変更いただいて結構です。また、合計液量(反応スケール)を変更する場合は、最適条件の比率を維持して下さい。
- プライマーは最終0.2～0.6μMを中心にご検討下さい。増幅効率がよくない場合、増量することにより向上する場合があります。ただし、入れすぎると非特異反応の原因となる場合もあります。
- 実際の調製では、必要本数分＋αについて、サンプル溶液以外を含むプレミックス溶液を調製し、所定量をチューブに分注後、最後に、各々のチューブに、サンプル溶液を添加して下さい。

(2)PCRの実施

- 以下のサイクルは一例です。まずは、3ステップで、お試し下さい。アニール温度は、プライマーのTmなどにより、55℃～65℃程度を中心に調節して下さい。勿論、プライマーによっては、その範囲外に最適値がある場合もあります。
- 本品はポリメラーゼの再活性化が極めて短時間で完了しますので、最初の変性時間は60秒、各サイクルの変性時間も15秒設定でPCRは可能です。初期変性時間は大抵の場合、1分程度で十分です。必要以上の加熱は、酵素活性を低下させて結果に影響を及ぼす可能性がありますので、特に5分以上の変性は避けて下さい。
- 蛍光検出チャンネルは、Channel F1を使用します。
- 2ステップでも可能です。この場合、data collectionはアニール・伸長ステップに設定して下さい。

[PCRサイクル(例)](3ステップ、アニール 60℃／伸長 72℃)

95℃　60秒
↓
95℃　15秒
60℃　15秒
72℃　30秒(data collection)　）×40サイクル
↓
融解曲線(Melting Curve)解析

４．逆転写酵素添加による1ステップ RT-PCR

(1)概要

- **本試薬は、**cDNA**やゲノム**DNA**などDNAサンプルをターゲットとしたPCR試薬ですが、逆転写酵素を加えることにより、**RNA**サンプルで1ステップ** RT-PCR**を実施することができます。しかし、1ステップ** RT-PCR**は、通常の**PCR**よりも非特異反応が発生しやすいですので、プライマーや条件によっては、インターカレーターアッセイが実施できない場合があることをご理解の上、ご検討下さい。**
- **本プロトコールは、当社の逆転写酵素「**ReverTra Ace®**」**(Code:TRT-101,102)**を用いた場合です。他社製逆転写酵素では最適条件が異なる場合があります。**

(2)反応液の調製

- **通常の**PCR**反応液組成に、「**RNase Inhibitor**」**(Code:SIN-101,102) 0.5U/μL、ReverTra Ace® 0.01～0.3U/μL(**いずれも最終濃度**)を添加します。その他の組成に変更はありません。また、プライマーダイマーの発生が見られる場合には、**ReverTra Ace®**の濃度を下げて、お試し下さい。**
- ReverTra Ace®**はそのままでは使いにくいので、希釈してご使用されることをお勧めします。**RNase Inhibitor**を蒸留水にて**5U/μL**に希釈し、これを希釈用液とします。これで**ReverTra Ace®**の希釈液(**RT**希釈液)を作製します。**RT**希釈液は用時調製とし、余った**RT**希釈液は廃棄して下さい。**
- **ゲノム**DNA**の混入など、**DNA**からの増幅をチェックする目的で、**RT(-)**コントロール(逆転写酵素を含まない反応液)をとられることをお勧めします。**

[RT**希釈液(例)**](ReverTra Ace® 3U/μL (**最終**0.3U/μL))

RT**希釈用液** (RNase Inhibitor 5U/μL)	32 μL
ReverTra Ace® (100U/μL)	1 μL
合計液量	33 μL

[PCR**反応液(例)**](**プライマー** 0.4μM**、反応スケール** 50μL)

蒸留水	11 μL
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	25 μL
プライマー 1 (10μM)	2 μL
プライマー 2 (10μM)	2 μL
RT**希釈液** (ReverTra Ace® 3U/μL)	5 μL
サンプル溶液	5 μL
合計液量	50 μL

- SYBR® Green Realtime PCR Master Mix**が合計液量の**1/2**であれば、その他の組成は最適な条件にご変更いただいて結構です。また、合計液量(反応スケール)を変更する場合は、最適条件の比率を維持して下さい。**LightCycler™**の標準液量は**20μL、LineGene**の標準液量は**10μL**です。**
- **プライマーは最終**0.2～0.6μM**を中心にご検討下さい。増幅効率がよくない場合、増量することにより向上する場合があります。ただし、入れすぎると非特異反応の原因となる場合もあります。**

・実際の調製では、必要本数分＋αについて、サンプル溶液以外を含むプレミックス溶液を調製し、所定量をチューブに分注後、サンプル溶液を添加して下さい。

(3)PCRの実施

・基本的に、通常のPCRサイクル(プロトコール１、２および３を参照)の最初に42℃ 20分程度の逆転写反応工程を付与し、最初の変性工程を5分程度に延長すること(逆転写酵素を完全に失活させ、PCR阻害を防ぐ)が必要です。その後は、プロトコール１、２および３を参照して、通常のサイクルを実施して下さい。
・以下のサイクルは一例です。アニール温度は、プライマーのTmなどにより、55℃～65℃程度を中心に調節して下さい。勿論、プライマーによっては、その範囲外に最適値がある場合もあります。

[ABI PRISM®7700(例)]
42℃ 20分
↓
95℃ 5分
↓
95℃ 15秒
60℃ 15秒
72℃ 45秒(data collection)
×40サイクル

[Roche LightCycler™(例)]
42℃ 20分
↓
95℃ 5分
↓
95℃ 5秒
55℃ 10秒
72℃ 15秒(data collection)
×40サイクル

[BioFlux LineGene(例)]
42℃ 20分
↓
95℃ 5分
↓
95℃ 15秒
60℃ 15秒
72℃ 30秒(data collection)
×40サイクル

［6］トラブルシューティング

１．増幅曲線がみられない、乱れる

(1) **装置の設定に関する問題(各装置の取扱説明書参照)**

原因	対策
ディテクターの設定などがSYBR® Green Iに適合していない	ディテクターの設定を適正化して再解析して下さい。
データコレクトの設定が不適切	設定を適正化して再実験して下さい。
サンプル位置の設定ミス	適正なサンプル位置を設定して再解析、あるいは再実験して下さい。
その他装置の故障・不具合	各装置の取扱説明書に従い、点検して下さい。

(2) **試薬に関する問題**

原因	対策
PCR反応条件・プライマーの濃度・配列などが不適切	プライマー濃度やPCR反応条件の変更をご検討下さい。増幅が悪い場合は、一般的にアニール温度を下げる、アニール時間を長くするか、プライマー濃度を上げてみます。まれに、逆にアニール温度を上げることや、伸長時間の延長などで向上することもあります。また、GC含量の高いターゲットでは、変性時間を延長することで、改善することもあります。それでも不良の場合は、プライマー再設計をお勧めします。
サンプルの純度が悪い	フェノール抽出やエタノール沈殿で精製して再実験して下さい。cDNAの場合、逆転写酵素の残留が影響する場合があります。

２．定量値がばらつく

(1) **装置の設定に関する問題(各装置の取扱説明書参照)**

原因	対策
装置の故障・不具合	装置の不具合により、温度管理や検出にばらつきが生じている場合があります。各装置の取扱説明書に従い、点検して下さい。

(2) **試薬に関する問題**

原因	対策
サンプルの純度が悪い	不良サンプルは、ばらつきの原因となります。均質なサンプルをご使用下さい。またcDNAの場合、逆転写酵素の残留が影響する場合があります。フェノール抽出やエタノール沈殿で精製して再実験して下さい。

PCR反応条件・プライマーの濃度・配列などが不適切	増幅効率の悪いPCR系は、ばらつきが大きい傾向があります。プライマー濃度やPCR反応条件の変更をご検討下さい。増幅が悪い場合は、一般的にアニール温度を下げる、アニール時間を長くするか、プライマー濃度を上げてみます。伸長時間の延長などでも向上することがあります。また、GC含量の高いターゲットでは、変性時間を長くすることで、改善することがあります。それでも、ばらつきが大きい場合は、プライマー再設計をお勧めします。
計量のばらつき	反応スケールを上げて再実験して下さい。

３．ブランクサンプルにシグナルがみられる

融解曲線分析を実施した上で、ご判断下さい。

(1) 融解曲線のピークが陽性サンプルと同じ温度である

原因	対策
陽性サンプルやPCR産物のコンタミネーション	まずは、ブランクに用いたサンプル(水)を更新して下さい。それでも発生する場合は、使用する蒸留水やプライマー、本マスターミックスなどを更新して再検討して下さい。

(2) 融解曲線のピークが陽性サンプルと異なる(低い)

原因	対策
プライマーダイマーなど非特異反応の発生	プライマー濃度やPCR反応条件の変更をご検討下さい。非特異反応が出る場合は、アニール温度を上げる、アニール時間、伸長時間を短くするか、プライマー濃度を下げてみます。3ステップ化も効果があることがあります。それでも発生する場合は、プライマー再設計をお勧めします。

［7］関連商品

品名	内容	Code No.
ReverTra Ace -α-®	100回用	FSK-101
ReverTra Ace®	10,000U×1本 50,000U×1本	TRT-101 TRT-102
RNase Inhibitor	2,500U×1本 2,500U×5本	SIN-101 SIN-102
Realtime PCR Master Mix	1mL×1本 1mL×5本	QPK-101T QPK-101

【製造･販売元】

東洋紡績株式会社

－納期･注文に関するお問い合わせ－

ライフサイエンス事業部 （大阪）
〒530-8230 **大阪市北区堂島浜二丁目** 2 **番** 8 **号**
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

ライフサイエンス事業部 （東京）
〒103-8530 **東京都中央区日本橋小網町** 17 **番** 9 **号**
TEL 03-3660-4819 FAX 03-3660-4951
E-mail : order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

－製品の内容･技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00〜12:00 , 13:00〜17:00 （**土、日、祝を除く**）
E-mail : techosk@bio.toyobo.co.jp
［URL］ http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/lifescience.html